应用合成生物学策略构建全细胞生物催化剂合成(*S*)-乙偶姻

李检秀[1,2]，陈先锐[1]，陈小玲[1]，黄艳燕[1]，莫棋文[1]，谢能中[1,2]*，黄日波[1,2]*

（1．广西科学院，非粮生物质酶解国家重点实验室，国家非粮生物质能源工程技术研究中心，广西生物炼制重点实验室，广西南宁 530007；2．广西大学生命科学与技术学院，亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室，广西南宁 530004）

摘要 目的：在大肠杆菌宿主中过量表达丁二酮还原酶（DAR），同时构建辅酶NADH原位再生系统，利用全细胞高效催化丁二酮不对称还原合成(*S*)-乙偶姻。方法：PCR克隆多粘芽孢杆菌（*Paenibacilluspolymyxa*）*dar*基因，连到质粒pETDuet-1，转化至大肠杆菌（*Escherichia coli*）BL21(DE3)，构建重组菌*E. coli* BL21(DE3)-DAR；通过HiTrap TALON柱亲和层析纯化表达产物DAR酶蛋白，测定DAR的比酶活和分子动力学参数。在重组菌*E. coli* BL21(DE3)-DAR中构建辅酶NADH原位再生系统，协同表达枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）的葡萄糖脱氢酶（GDH），构建重组菌*E. coli* BL21(DE3)-DAR/GDH，并以此重组菌为全细胞生物催化剂，优化催化条件，提高(*S*)-乙偶姻的产量和产率。结果：获得重组工程菌*E. coli* BL21(DE3)-DAR和*E. coli* BL21(DE3)-DAR/GDH。DAR以NADH为辅酶还原丁二酮的米氏常数K_m、最大催化速率V_{max}、催化常数K_{cat}分别为2.59 mM，1.64 μmol/L·min·mg，12.3 /s，还原丁二酮生成(*S*)-乙偶姻光学的纯度为95.86 %，具有较好的催化效率和立体异构体选择性。构建辅酶NADH原位再生系统后，重组菌*E. coli* BL21(DE3)-DAR/GDH可高效催化丁二酮合成乙偶姻。在最优催化条件下分批补料，乙偶姻产量达51.26 g/L，转化率81.37 %，生产速率5.13 g/(L·h)。结论：使用非手性化合物原料丁二酮生产高附加值的手性化合物(*S*)-乙偶姻，以重组菌为全细胞生物催化剂合成(*S*)-乙偶姻，不需额外添加昂贵的辅酶，具有较高的生产应用价值。

关键词：全细胞生物催化剂；辅酶再生系统；丁二酮还原酶；乙偶姻

基金项目：获广西科技计划项目（No. 桂科合14125008-2-22），国家自然科学基金（No. 21466007和No. 31400079）项目资助。

*通讯作者，电子邮箱：xienengzhong@gxas.cn, jianxiuli@gxas.cn。

Construct Whole-cell Biocatalyst and Produce (*S*)-Acetoin via Synthetic Biology Strategy

LI Jian-xiu, Chen Xian-rui, Chen Xiao-ling, Huang Yan-yan, Mo Qi-wen, Xie Neng-zhong*, Huang Ri-bo*

(1. National Engineering Research Center for Non-food Biorefinery, State Key Laboratory of Non-food Biomass Energy and Enzyme Technology, and Guangxi Key Laboratory of Biorefinery, Guangxi Academy of Sciences, 98 Daling Road, Nanning, 530007, China; 2.State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-Bioresources, College of Life Science and Technology, Guangxi University, 100 Daxue Road, Nanning, 530004, China)

Abstract: **Objective:** The whole-cell biocatalyst, overexpressing diacetyl reductase (DAR) and introduced *in situ*-NADH regeneration systems was applied to improve (*S*)-acetoin production from prochiral diacetyl. **Methods:** The gene encoding DAR from *Paenibacillus polymyxa* was cloned and expressed in *Escherichia coli*. Recombine DAR was purified by HiTrap TALON affinity chromatography, then enzyme activities and molecular kinetic parameters of purified DAR were measured. NADH *In-situ* regeneration system based on glucose dehydrogenase (GDH) from *Bacillus subtilis* was introduced. The whole-cell biocatalyst, overexpressing DAR and GDH was applied to (*S*)-acetoin produce and the reaction conditions were optimized. **Results:** DAR showed a high catalytic efficiency and enantioselective (enantiomeric purity 95.86%). The K_m, V_{max} and K_{cat} values of DAR for diacetyl were 2.59 mM, 1.64 μmol/L·min·mg and 12.3/s, respectively. The whole-cell biocatalyst, introduced *in situ*-NADH regeneration systems resulted in higher (*S*)-acetoin concentration, productivity and yield form diacetyl. Under optimal conditions in fed-batch bioconversion, 51.26 g/L (*S*)-acetoin was produced from 63 g/L diacetyl with a productivity of 5.13 g/(L·h). **Conclusion:** The compound of prochiral diacetyl was used as substrate for asymmetric synthesis of high value chiral (*S*)-acetoin. The results demonstrated that whole-cell biocatalyst, introduced *in situ*-NADH regeneration systems, can effectively improve the production of (*S*)-acetoin with good applicability and economic performance.

Key words: Whole-cell biocatalyst; Cofactor regeneration; Diacetyl reductase; (*S*)-Acetoin

乙偶姻(acetoin, AC)，又名3-羟基-2-丁酮，甲基乙酰基原醇，天然存在于玉米、草莓、葡萄、可可、酒类等食品中。乙偶姻具有特殊的奶油、白脱样香气，高度稀释后散发令人愉快的奶香气，是一种应用广泛、符合国家标准GB2760-86的食品香料添加剂[1, 2]。同时，乙偶姻作为一种重要的四碳化合物，2004年被美国能源部列为30种优先开发利用的平台化合物之一，在烟酒、化妆品、医药、化工等行业具有广泛的用途，全球需求量超过一万吨/年[3-5]乙偶姻分子内含手性碳原子，存在(*S*)-乙偶姻和(*R*)-乙偶姻两种立体异构体。单一构型的乙偶姻不仅具有普通乙偶姻的基本功能，还因其独特的立体结构在不对称合成方面优势突出，尤其在高附加值手性药物中间体、化学中间体、液晶材料等方面具有重要应用，因此光学纯(*S*)-乙偶姻的应用范围和市场前景远超普通乙偶姻。

目前，国内外生产乙偶姻的方法主要为化学合成法和微生物合成法。研究及应用较多的化学合成法是丁二酮部分加氢还原法和2,3-丁二醇选择性氧化法[6]。这两种化学合成方法均存在产品回收率低、环境污染严重、容易掺杂致癌致病化合物等缺点。随着生活水平的提高，人们对天然绿色产品的需求越来越高，微生物发酵生产的乙偶姻属于天然香料，其市场价格要远远高于化学合成的产品。自然界中许多微生物能够利用葡萄糖等碳源物质经糖酵解途径代谢产生乙偶姻。2007年Xiao等[7]利用枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）CICC 10025发酵乙偶姻，产量34.5 g/L，生产速率0.627 g/(L·h)。2012年张燎原等[8]利用多粘芽孢杆菌（*Paenibacillus polymyxa*）LY107，以葡萄糖/木糖为底物发酵生产乙偶姻，产量23.9 g/L，生产率0.569 g/(L·h)。2013年郝飞[9]以枯草芽孢杆菌*B. subtilis* CCTCC M 208175为发酵菌株，通过补料分批发酵手段生产乙偶姻，产量58.7 g/L，生产速率1.22 g/(L·h)。尽管微生物发酵生产天然乙偶姻取得了丰硕的研究成果，但与传统化学法一样，天然菌株发酵生产的乙偶姻通常是(*S*)-乙偶姻和(*R*)-乙偶姻两种立体异构体的混合物[3, 10]，且α-乙酰乳酸自发氧化脱羧产生丁二酮的效率很低，乙偶姻生产菌株的主要产物是(*R*)-乙偶姻，(*S*)-乙偶姻仅作为副产物存在，所占比例极低。此外(*R*)-乙偶姻和(*S*)-乙偶姻的物理化学性质相近，需经过工艺复杂的手性拆分才能获得一定旋光度的乙偶姻，成本高昂，导致(*S*)-乙偶姻的市场价格居高不下，极大地限制了其发展和应用。

酶催化法是应用微生物酶作为催化剂直接进行氧化还原反应。已有报道利用丁二酮还原酶催化丁二酮合成(*S*)-乙偶姻，或利用(*R,R*)-2,3-丁二醇脱氢酶催化(*R,R*)-2,3-丁二醇氧化合成(*R*)-乙偶姻[11, 12]，产物单一，光学纯度高。Gao等[3]利用纯化的羧基还原酶和葡萄糖脱氢酶体外合成(*S*)-乙偶姻，产量12.2 g/L，生产速率9.76 g/(L·h)。尽管生产速率较快，但产量低，同时酶的提取纯化还存在工艺复杂、成本高、稳定性差等问题。

全细胞生物催化（Whole-cell biocatalysis）是利用完整的细胞作为催化剂进行转化，其本质是利用细胞内的酶进行催化，综合了发酵法和酶法催化的优点，具有高立体异构体选择性[13]。本研究首先在大肠杆菌（*Escherichia coli*）宿主中过量表达多粘芽孢杆菌 DSM 365 的丁二酮还原酶（Diacetyl reductase, DAR）[14]，然后在重组菌 *E.coli* BL21(DE3)-DAR 中引入辅酶 NADH 原位再生系统，协同表达枯草芽孢杆菌 *B. subtilis*168 葡萄糖脱氢酶（Glucose dehydrogenase, GDH），利用全细胞高效不对称还原催化丁二酮合成乙偶姻。采用分批补料策略，乙偶姻产量达到 51.26 g/L，生产效率 5.13 g/(L h)。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒与引物

菌株、质粒与引物见表 1。*E. coli* DH5α和 *E. coli* BL21(DE3)分别用做克隆宿主和表达宿主，pETDuet-1 为出发表达质粒。

表 1 菌株、质粒与引物

Table1. Strains, plasmids and primers

Strains, plasmids and primers	Feature or sequence	Source
Strains	**Feature**	
P. polymyxa DSM 365	Mutant	本实验室选育
B. subtilis 168	ATCC 27370	本实验室保存
E. coli DH5α	*supE44 △lacU169 (φ80 lacZ△M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*	Novagen
E. coli BL21(DE3)	*F⁻ ompT hsdSB (rB⁻mB⁻) gal (λ c I 857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5 T7gene1) dcm (DE3)*	Novagen
E. coli BL21(DE3)-pETDuet	*E. coli* BL21(DE3)carrying pETDuet-1	This study
E. coli BL21(DE3)-DAR	*E. coli* BL21(DE3) carryingpETDuet-*dar*	This study
E. coli BL21(DE3)-DAR/GDH	*E. coli* BL21(DE3) carryingpETDuet-*dar/gdh*	This study
Plasmids	**Feature**	
pETDuet-1	Overexpression vector; Amp^r	Novagen
pETDuet-*dar*	*dar* in pETDuet-1	This study
pETDuet-*dar/gdh*	*dar* and *gdh* in pETDuet-1	This study
Primers	**Sequence**	
P1 (*dar- BamH* I-F)	5'- CGC*GGATCC*GGAACTTAAGAATAAAACAGC -3'	
P2 (*dar- Hind* III-R)	5'- CCC*AAGCTT*CTACTGTGGGTTGGTTGT -3'	
P3 (*gdh-Nde* I-F)	5'-GGAATTC CATATG TATCCGGATTTAAAAGG-3'	
P4 (*gdh-Aat* II-R)	5'-TATCCA GACGTC TTAACCGCGGCCTGC-3'	

1.1.2 培养基与缓冲液

LB 培养基（1 L）：蛋白胨 10 g，酵母提取物 5 g，NaCl 10 g，pH 7.0，用于大肠杆菌种子活化，重组工程菌株诱导表达。

磷酸钾缓冲液（100 mmol/L）：溶液 A，0.2 mol/L KH_2PO_4；溶液 B，0.2 mol/L K_2HPO_4。参照《精编分子生物学实验指南》[15]表 A.1.3 所列 pH 混合体系混合溶液 A 和溶液 B，加 ddH_2O 定容至 200 mL，得到相应 pH 值的磷酸钾缓冲液。

1.1.3 工具酶与试剂

限制性内切酶、碱性磷酸酶（CPI）、T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司；PrimeSTAR GXL DNA 聚合酶购自大连宝生物有限公司；细菌基因组提取试剂盒、质粒小提试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自天根生化（北京）科技有限公司；氨苄青霉素、异丙基硫代半乳糖苷（IPTG）、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（NADH/NAD^+）购自生工生物工程（上海）有限公司；丁二酮购自上海贝合化工有限公司；酵母提取物和蛋白胨为 Oxoid 公司产品；引物合成、DNA 序列测定服务由南京金斯瑞生物科技有限公司提供。其它化学试剂均为国产分析纯或以上。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒的构建

根据 NCBI 中多粘芽孢杆菌 DSM 365 全基因组 *dar* 基因序列（GeneBank Accession No. KT717931），枯草芽孢杆菌 *B. subtilis*168 全基因组 *gdh* 基因序列（GeneBank Accession No. CP019663.1）分别设计引物 P1/P2 和 P3/P4（表 1）。提取多粘芽孢杆菌 DSM 365 基因组并作为模板，以 P1、P2 引物进行 PCR 扩增，得到 *dar* 片段；提取枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* 168 基因组并作为模板，以 P3、P4 引物进行 PCR 扩增，得到 *gdh* 片段。PCR 反应体系和程序参照 Takara PrimeSTAR GXL DNA 聚合酶产品说明书。纯化后的 *dar* 片段用 *BamH* I 和 *Hind* III 双酶切，连接到经过相同酶切的 pETDuet-1 上，构建重组质粒 pETDuet-*dar*。以同样的方法将 *gdh* 片段用 *Nde* I 和 *Aat* II 双酶切，连接到 pETDuet-*dar* 上，得到重组质粒 pETDuet-*dar/gdh*。将 pETDuet-1 以及上述构建得到 pETDuet-*dar*、pETDuet-*dar/gdh* 质粒分别转化至大肠杆菌 BL21(DE3)中，得到 *E.coli* BL21(DE3)-pETDuet、*E.coli* BL21(DE3)-DAR、*E.coli* BL21(DE3)-DAR/GDH 重组菌。

1.2.2 DAR 的表达和纯化

将构建好的重组菌 *E. coli* BL21(DE3)-DAR 过夜活化，按 2 %接种量转接至新鲜 LB 培养液，37°C 培养至 OD_{600} 为 0.6~0.8，加入 0.2 mM IPTG 后，20°C 诱导 12 h。离心收集菌体，用生理盐水洗涤 2 次后重悬于结合缓冲液（20 mM 磷酸钾，500 mM NaCl，pH 7.4），冰浴超声破碎，超声后菌体于 4°C 经 12 000r/min 离心 30 min 收集上清液，用 HiTrap TALON 柱亲和层析纯化，调整洗脱缓冲液咪唑浓度，收集目标蛋白洗脱液，用 PD-10 Desalting columns 柱脱盐除咪唑后置于-80°C 冰箱保存备用。

1.2.3 DAR 的酶学性质分析

1 mL 酶活测定反应体系中含 100 mM 磷酸盐缓冲液（pH 6.0）、5 mM 丁二酮、0.2 mM NADH 和一定量的酶液，通过 340 nm 处吸光值的减少间接检测丁二酮还原酶活性。酶活定义为：每 1 min 时间催化消耗 1 μmol NADH 所需酶量为一个酶活力单位（1U）。在 40°C，pH 6.0 磷酸盐缓冲液（100 mM）中进行动力学参数 K_m、V_{max}、K_{cat} 值的测定，保持 pH、缓冲液、辅酶、酶浓度等参数不变，丁二酮浓度[*S*]从 0.125 mM 至 20 mM 依次递增，测定其反应速度 *V*，所得数据通过 Origin 非线性拟合得到 K_m 和 V_{max}，进而计算出 K_{cat}。

丁二酮还原酶立体异构体选择性：1 mL 酶促反应体系中（100 mM 磷酸盐缓冲液，pH 6.0），加入 100 mM 丁二酮，60 mM NADH 和适量酶液，40°C 条件下反应 24 h。用等体积乙酸乙酯萃取，用手性气相色谱柱检测酶催化反应产物的光学纯度。

1.2.4 休止细胞的制备

将成功构建并保存的重组菌 *E. coli* BL21(DE3)-pETDuet、*E. coli* BL21(DE3)-DAR、*E. coli* BL21(DE3)-DAR/GDH 分别接种至 LB 液体培养基（100 μg/mL 氨苄青霉素）中 37°C 过夜活化；活化后的种子液按 2%接种量转接至新鲜 LB 培养液（100 μg/mL 氨苄青霉素，200 mL/500 mL 锥形瓶），37°C，250 r/min 震荡培养至 OD_{600}=0.6~0.8，加入 0.2 mM IPTG，20°C，125 r/min 诱导 12 h；离心收集菌体，生理盐水洗涤 2 次后重悬于 100 mM 磷酸盐缓冲液，4°C 冰箱保存。后续用于 12.5% SDS-PAGE 电泳检测，全细胞生物催化。

1.2.5 全细胞生物催化合成乙偶姻以及催化条件优化

在摇瓶中进行全细胞催化条件优化（10 mL/50 mL 锥形瓶），转速为 150 r/min，温度为 30°C，pH 控制在 7.0，100 mM 磷酸盐缓冲液，8 $g_{(DCW)}$/L 休止细胞，30 g/L 葡萄糖，15 g/L

丁二酮（葡萄糖/丁二酮摩尔比 1:1），反应 3 h。依次对催化反应中细胞干重、缓冲液 pH、反应温度、葡萄糖/丁二酮摩尔浓度比、催化反应转速、起始丁二酮浓度进行优化。

1.2.6 分析方法

（1）菌体生长的测定：紫外分光光度计测定菌体在 600 nm 处的吸光值 OD_{600}，对应细胞干重（DCW, Dry cell weight）曲线求得菌体干重值。细胞干重与 OD_{600} 测定的标准曲线换算公式为：DCW (g/L)=0.3 × OD_{600}。

（2）葡萄糖含量测定：反应液 12 000 r/min，离心 5 min，取上清稀释至合适倍速，SBA-40D 生物传感分析仪测定。

（3）丁二酮和乙偶姻含量采用气相色谱系统（Agilent 7890A 气相色谱仪）检测。色谱柱为 Phenomenex ZB-WAXplus 毛细管色谱柱（30 m × 0.32 mm × 0.25 μm）；检测器为 FID 氢火焰检测器。载气为氮气，流速 1.6 mL/min。进样口、检测器温度 250°C。升温程序：起始柱温 100°C，保留 1 min；20°C/min 升温至 180°C，保留 3 min；最后 30°C/min 升温至 230°C，保留 1 min。

（4）(*S*)-乙偶姻光学纯的检测。所用气相色谱柱为 Agilent Cyclosil-B 手性色谱柱（30 m × 0.32 mm × 0.25 μm）；检测器为 FID 氢火焰检测器。载气为氮气，流速 1.6 mL/min。进样口温度和检测器温度 240°C。升温程序：起始柱温度 100°C，保留 1 min，然后以 10°C/min 的速度升温至 120°C，以 6°C/min 的速度升温至 130°C，以 20°C/min 的速度升温至 230°C。(*S*)-乙偶姻光学纯度计算式：[S]/([S]+[R]) × 100%，式中[S]代表(*S*)-乙偶姻峰面积，[R]代表(*R*)-乙偶姻峰面积。

2　结果与分析

2.1 DAR 和 GDH 表达载体的构建

将 PCR 扩增得到 *dar* 片段（720 bp *BamH* I/*Hind* III），酶切连接至 pETDuet-1，构建重组质粒 pETDuet-*dar*。同样的方法将 *gdh* 片段（786 bp *Nde* I/*Aat* II），酶切连接至 pETDuet-*dar* 上，构建重组质粒 pETDuet-*dar/gdh*。分别对重组质粒 pETDuet-*dar* 和 pETDuet-*dar/gdh* 进行酶切验证，如图 1(a)所示，重组质粒 pETDuet-*dar* 经 *BamH* I 单酶切产生了 6 092 bp 的单一条带，经 *BamH* I/*Hind* III 双酶切，产生了 5 372 bp 和 720 bp 的两条带，与预计大小一致。由图 1(b)可知，重组质粒 pETDuet-*dar/gdh* 经 *Nde* I 和 *Nde* I/*Aat* II 双酶切，分别产生 6 836 bp 的单一条带和 6 050 bp/ 786 bp 两条带。进一步将酶切验证正确的重组质粒送至南京金斯瑞

测序，测序结果与 GenBank 报道的序列一致，证明重组质粒 pETDuet-*dar* 和 pETDuet-*dar/gdh* 构建成功。

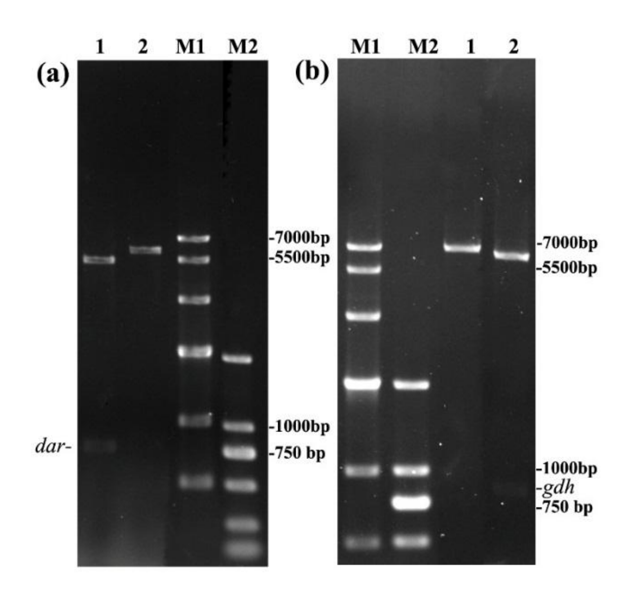


图 1 重组质粒的酶切验证

Figure 1. Identification of the recombinant plasmid by enzyme digestion.

（a）泳道 1：pETDuet-*dar* (*BamH* I 单酶切)；泳道 2：pETDuet-*dar* (*BamH* I/*Hind* III 双酶切)；M1：marker IV；M2： marker DL2000；（b）M1：marker IV；M2：marker DL2000；泳道 1：pETDuet-*dar/gdh* (*Nde* I 单酶切)；泳道 2：pETDuet-*dar/gdh* (*Nde* I/*Aat* II 双酶切)

(a) Lane 1: pETDuet-*dar* digested by *BamH* I; Lane 2: pETDuet-*dar* digested by *BamH* I and *Hind* III; M1: marker IV; M2: marker DL2000; (b) M1: marker DL2000; M2: marker IV; Lane 1: pETDuet-*dar/gdh* digested by *Nde* I; Lane 2: pETDuet-*dar/gdh* digested by *Nde* I and *Aat* II.

2.2 DAR 和 GDH 的诱导表达及 DAR 的纯化

分别将重组质粒 pETDuet-*dar* 和 pETDuet-*dar/gdh* 转化大肠杆菌 BL21(DE3)，挑取转化子于 LB 培养基中用 IPTG 诱导培养，收集的菌体经预处理后进行 SDS-PAGE 分析。结果（图 2）显示，重组菌 *E. coli* BL21(DE3)-DAR、*E. coli* BL21(DE3)-DAR/GDH 分别在大约 27 KDa、27 KDa 和 29 KDa 处有特异性条带，表明 DAR，DAR 和 GDH 分别在 *E. coli* BL21(DE3)-DAR 和 *E. coli* BL21(DE3)-DAR/GDH 中获得高效表达。将 *E. coli* BL21(DE3)-DAR 发酵菌体经冰浴超声破碎，HiTrap TALON 柱亲和层析纯化，得到大小约 27 KDa 的单一条带。

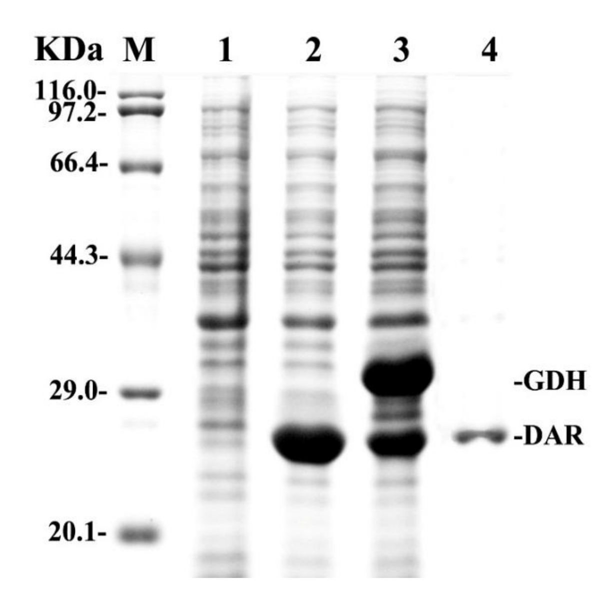


图 2 DAR 和 GDH 在 *E. coli* BL21(DE3)中的表达及纯化

Figure 2. SDS-PAGE analysis of DAR and GDH expressed in *E. coli* BL21(DE3) and the purified recombinant DAR.

M：蛋白 marker；泳道 1：*E.coli* BL21(DE3) -pETDuet；泳道 2：*E.coli* BL21(DE3)-DAR；泳道 3：*E.coli* BL21(DE3)-DAR/GDH；泳道 4：纯化的 DAR

M: marker; Lane 1: *E.coli* BL21(DE3)-pETDuet; Lane 2: *E.coli* BL21(DE3)-DAR; Lane 3: *E.coli* BL21(DE3)-DAR/GDH; Lane 4: Purified recombinant DAR.

2.3 DAR 的酶学性质

根据米氏方程，得出 DAR 对底物丁二酮的动力学参数（K_m、V_{max}、K_{cat}）：DAR 以 NADH 为辅酶还原丁二酮的米氏常数 K_m、最大催化速率 V_{max}、催化常数 K_{cat} 分别为 2.59 mM，1.64 μmol/L·min·mg，12.3/s，DAR 催化丁二酮生成(*S*)-乙偶姻的光学纯度为 95.86 %。说明多粘芽孢杆菌 DSM 365 丁二酮还原酶有较好的催化效率和立体异构体选择性，可用于构建全细胞催化剂催化合成(*S*)-乙偶姻。

2.4 全细胞生物催化剂催化

分别取适量休止细胞 *E. coli* BL21(DE3)-pETDuet、*E. coli* BL21(DE3)-DAR、*E. coli* BL21(DE3)-DAR/GDH，进行全细胞生物催化。由于每合成 1 分子(*S*)-乙偶姻需要消耗 1 分子还原型辅酶 NADH，重组菌 *E. coli* BL21(DE3)-DAR 依靠内源性辅酶再生系统，催化合成 2.21 g/L 乙偶姻，生产速率仅 0.74 g/(L·h)。构建辅酶再生系统后，催化效率大幅提高。相同条件下，重组菌 *E. coli* BL21(DE3)-DAR/GDH 可催化合成 5.03 g/L 乙偶姻，生产速率 1.68

g/(L·h)，是单独表达丁二酮还原酶时的 2.28 倍（表 2）。

表 2 全细胞生物催化剂的生物转化

Table 2. The products of batch bioconversion with whole-cell biocatalyst

菌株 Strain	丁二酮 Diacetyl（g/L）	乙偶姻 Acetoin（g/L）	生产速率 Productivity (g/(L·h))
E. coli BL21(DE3)-pETDuet	14.35 ± 0.28	ND [1]	ND
E. coli BL21(DE3)-DAR	12.72 ± 0.05	2.21 ± 0.33	0.74 ± 0.11
E. coli BL21(DE3)-DAR/GDH	9.76 ± 0.39	5.03 ± 0.48	1.68 ± 0.16

[1)] Represents no data.

2.5 全细胞生物催化剂催化条件优化

为了提高全细胞生物催化剂合成乙偶姻的效率，分别考察了生物催化合成中的相关因素对乙偶姻生物合成的影响。由于菌体浓度限制了合成过程中生物催化剂的总量，pH 和温度又与催化反应中细胞催化剂的活力和稳定性密切相关，依次对催化反应中菌体浓度、pH、温度 3 个单因素进行了优化。结果如图 3(a)、(b)、(c)所示，在 100 mM 磷酸盐缓冲液体系，全细胞催化生物合成乙偶姻的最适干细胞浓度为 12 $g_{(DCW)}/L^{-1}$，最适 pH 为 6.5，最适温度 40°C。

进一步考察葡萄糖/丁二酮摩尔浓度比和摇床转速对全细胞催化合成乙偶姻的影响。由图 3(d)可知，随着葡萄糖/丁二酮摩尔浓度比的增加，乙偶姻的产量显著增加，当葡萄糖/丁二酮摩尔浓度比为 3.0，乙偶姻产量最高，而后下降。图 3(e)显示，当摇床转速在 75~100 r/min 时催化效率较高，继续增加转速，乙偶姻产量下降。说明微氧环境下胞内的氧化还原状态更适合 DAR 催化。最后考察了丁二酮起始浓度对生物转化的影响。乙偶姻产量随着丁二酮起始浓度增加而增加，当丁二酮起始浓度为 17.5 g/L 时，乙偶姻产量 16.24 g/L，转化率 92.8%，继续增加丁二酮起始浓度，乙偶姻产量虽有所增长，转化率却呈下降趋势。当丁二酮起始浓度为 22.5 g/L 时，乙偶姻产量最高，达 18.85 g/L，对应转化率仅 83.7%（图 3(f)）。原因应当是高浓度底物抑制了菌体活力，进而影响了催化效率。

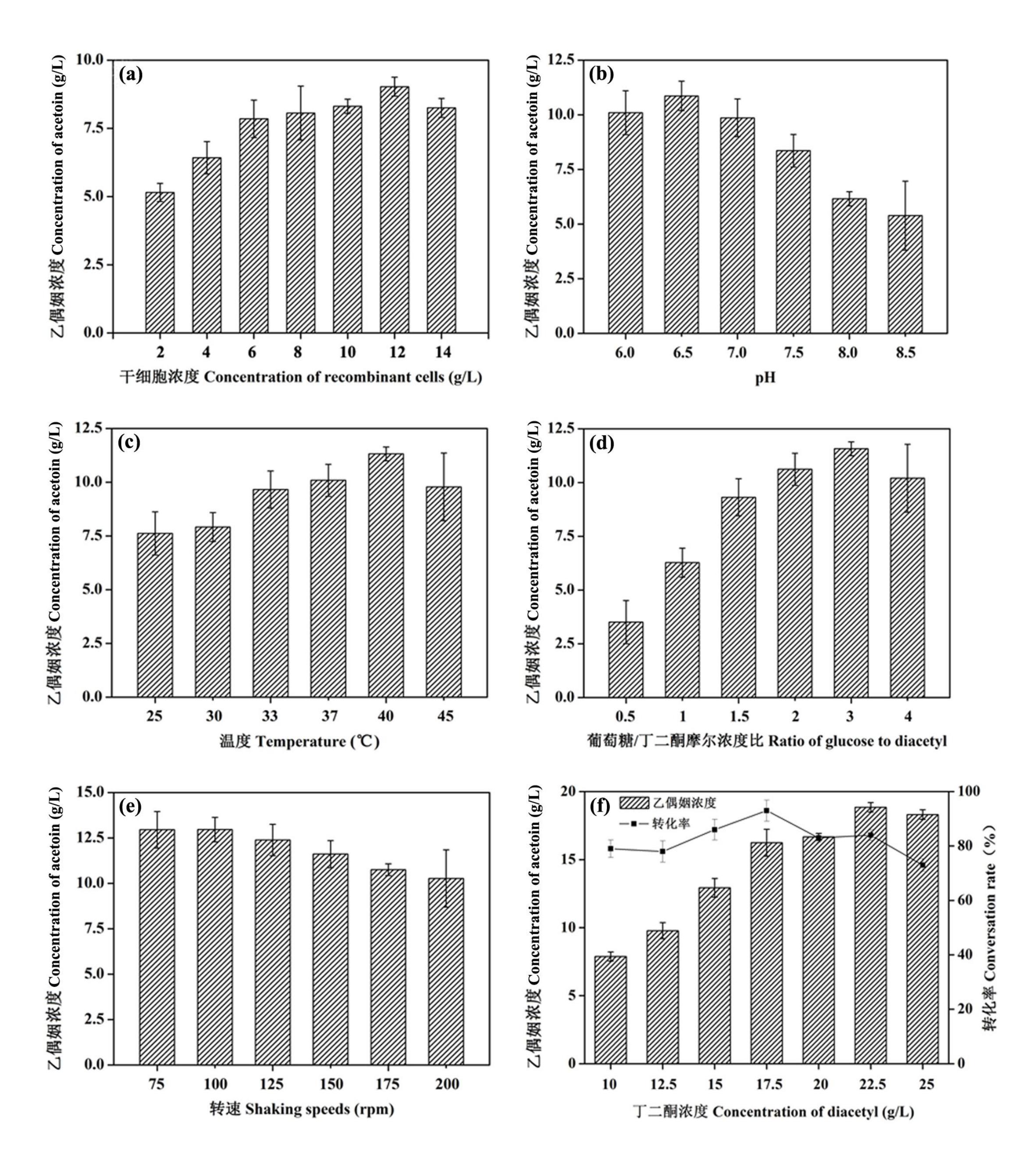


图 3 全细胞生物催化剂催化条件的优化

Figure 3. Optimization of biocatalysis conditions.

（a）干细胞浓度;（b）pH;（c）温度;（d）葡萄糖/丁二酮摩尔浓度比;（e）转速;（f）丁二酮浓度

(a) Concentration of recombinant; (b) pH; (c) Temperature; (d) Ratio of glucose to diacetyl; (e) Shaking speeds; (f) Concentration of diacetyl.

2.6 优化催化条件下补料合成乙偶姻

由图 3(f)可知，起始丁二酮浓度过高会抑制菌体活性，进而影响乙偶姻的催化合成。有效的补料策略可以显著提高目标产物的产量[16]，为了得到更高浓度的乙偶姻，在最适催化条件的基础上进行补料合成乙偶姻。每隔 1.5 h 取样，检测丁二酮和葡萄糖残量、乙偶姻产

量，并根据需要补加丁二酮和葡萄糖，调整 pH 至 6.5，以促使催化反应有效进行。结果（图4）显示，催化反应 10 h 后，累计消耗 63 g/L 丁二酮，转化合成 51.26 g/L 乙偶姻，转化率 81.37%，生产速率 5.13 g/(L·h)。

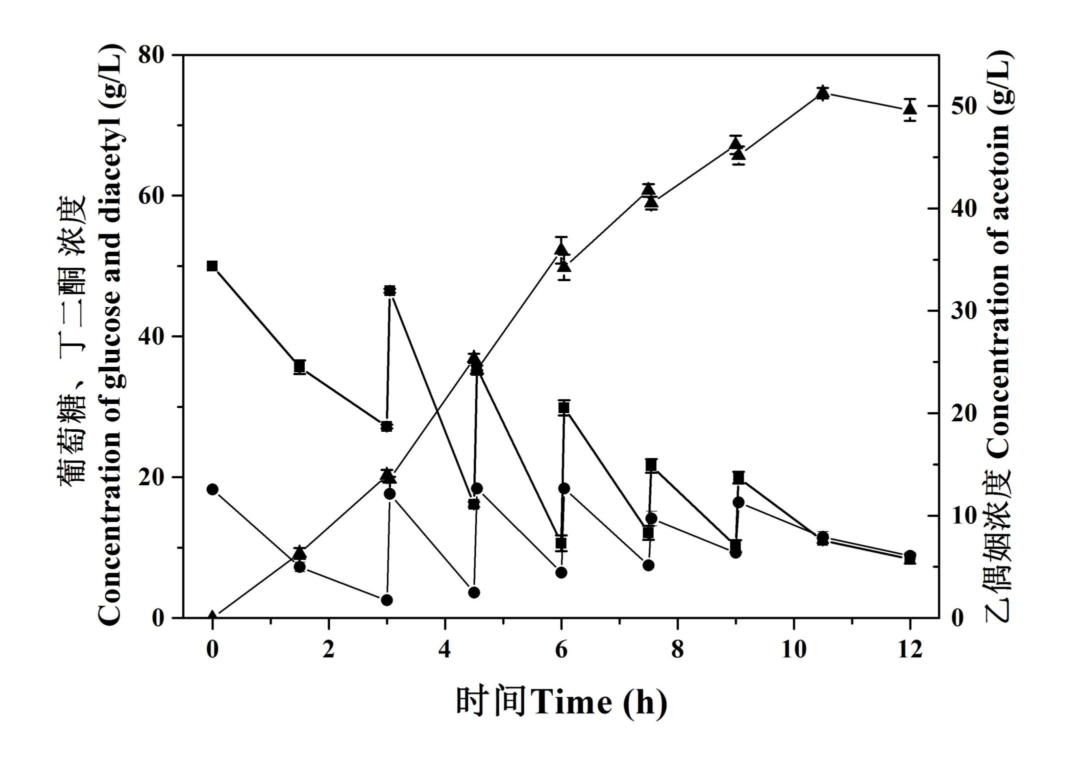


图 4 优化催化条件下的补料生物合成

Figure 4. Fed-batch bioconversions under optimal condition.

（▲）乙偶姻；（●）丁二酮；（○）葡萄糖

（▲）Acetoin; （●）Diacetyl; （○）Glucose.

3　讨论

多粘芽孢杆菌是目前为止发现的唯一能够高效生产高光学纯(*R,R*)-2,3-丁二醇的天然微生物[14, 17-19]。前期对多粘芽孢杆菌 DSM 365 进行全基因组测序与注释，挖掘到合成(*S*)-乙偶姻的关键酶——丁二酮还原酶 DAR 的编码基因[14]。本文首次对该丁二酮还原酶基因 *dar* 进行克隆表达和纯化，酶学性质分析表明，DAR 以 NADH 为辅酶还原丁二酮的米氏常数 K_m 为 2.59 mM、最大催化速率 V_{max} 为 1.64 μmol/L·min·mg、催化常数 K_{cat} 为 12.3/s，催化丁二酮生成(*S*)-乙偶姻的光学纯度为 95.86 %，具有较好的催化效率和立体异构体选择性，可应用于制备酶制剂或全细胞生物催化剂合成(*S*)-乙偶姻。

全细胞生物催化的本质是利用细胞内的酶进行催化，克服了发酵法和酶法存在的诸多缺点，具有高立体异构体选择性，相比纯酶催化剂，胞内酶稳定性更好，成本更低。大肠杆菌

属于非致病菌株，具有生长繁殖快、易实现高密度培养等优点，此外该菌遗传背景清晰、遗传操作技术成熟，是用于构建微生物细胞工厂合成(*S*)-乙偶姻的首选宿主之一。Gao 等[20]将多粘芽孢杆菌 *P. polymyxa* ZJ-9 的丁二酮还原酶基因导入 *E. coli* Rosetta (DE3)，反应所需 NADH 由宿主内源酶系催化葡萄糖产生。补料催化生产(*S*)-乙偶姻 39.4 g/L。由于每催化丁二酮产生 1 分子乙偶姻，需要消耗一分子 NADH/NADPH，而宿主内源 NADH/NADPH 再生系统效率较低，因此该催化反应周期较长（20 h），生产速率仅 1.97 g/(L·h)。Xiao 等[21]在大肠杆菌 BL21(DE3)中引入短乳杆菌（*Lactobacillus brevis*）的 NADH 氧化酶，成功构建胞内辅酶再生系统，(*S*)-乙偶姻产量达 36.7 g/L，是单独表达(2*R*,3*R*)-2,3-丁二醇脱氢酶时的 2.06 倍（17.8 g/L）。由此可见，构建合适的胞内辅酶再生系统，对提高全细胞生物催化剂的催化效率十分有效。然而该方法所用底物为光学纯 *meso*-2,3-丁二醇，原料成本高昂，难以实现规模化量产。

枯草芽孢杆菌葡萄糖脱氢酶稳定性好，适用性广（NAD^+和 $NADP^+$依赖型），广泛应用于生物催化氧化还原反应的辅酶再生[3, 22, 23]。本研究在大肠杆菌系统中构建外源辅酶再生系统，同时表达丁二酮还原酶 DAR 和葡萄糖脱氢酶 GDH，催化效率大幅提高。相同条件下，重组菌 *E.coli* BL21(DE3)-DAR/GDH 催化合成乙偶姻的产量和速率是单独表达 DAR 时的 2.28 倍。优化催化条件，以重组菌 *E. coli* BL21(DE3)-DAR/GDH 为全细胞生物催化剂分批补料还原丁二酮，乙偶姻产量达到 51.26 g/L，生产速率 5.13 g/(L h)。所用原料丁二酮为非手性化合物，解决了手性化合物底物成本高昂的难题，具有较高的生产应用价值。需要说明的是，本研究中使用全细胞生物催化剂合成(*S*)-乙偶姻的光学纯度与纯酶催化相比，略有下降。可能与大肠杆菌自身携带的丁二酮还原酶、甘油脱氢酶等酶系的非特异性催化有关。

参考文献

[1] Xiao Z J, Lu J R. Strategies for enhancing fermentative production of acetoin: A review. Biotechnol Adv, 2014, 32: 492-503.

[2] Xiao Z J, Lu J R. Generation of acetoin and its derivatives in foods. J Agric Food Chem, 2014, 62: 6487-6497.

[3] Gao C, Zhang L, Xie Y, et al. Production of (3*S*)-acetoin from diacetyl by using stereoselective NADPH-dependent carbonyl reductase and glucose dehydrogenase. Bioresour Technol, 2013, 137: 111-115.

[4] Werpy T A, Petersen G. Top value added chemicals from biomass: I. Results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas. US Department of Energy, 2004.

[5] Zhang LY, Singh R S, Sivakumar D, Guo Z W, Li J H, Chen F B, et al. An artificial synthetic pathway for acetoin, 2,3-butanediol, and 2-butanol production from ethanol using cell free multi-enzyme catalysis. Green Chemistry. 2018;20:230-42.

[6] 甄德帅. 香料乙偶姻（3-羟基-2-丁酮）化学工艺合成现状. 黔南民族师范学院学报, 2015; 35: 121-124.

Zhen D S. On the current chemical synthesis techniques of acetoin flavor. Journal of qiannan normal college for nationalities, 2015; 35: 121-124.

[7] Xiao Z J, Liu P H, Qin J Y, et al.Statistical optimization of medium components for enhanced acetoin production from molasses and soybean meal hydrolyzate. Appl Microbiol Biotechnol, 2007, 74: 61-68.

[8] 张燎原, 洪欲强, 陈双, 等. 以葡萄糖和木糖为双底物生物合成乙偶姻的条件优化. 化学与生物工程, 2012, 29(7): 30-35.

Zhang L Y, Hong Y Q, Chen S, et al. Optimization of co-fermentation condition of glucose and xylose for acetoin production. Chemistry and Bioengineering, 2012, 29(7): 30-35.

[9] 郝飞. 枯草芽孢杆菌发酵生产乙偶姻的研究. 江南大学硕士学位论文, 2013.

Hao F. Improvement to acetoin fermentation technology by *Bacillus subtilis* CCTCC M 208157. Master Thesis of Jiang Nan University, 2013.

[10] Xu Q, Xie L, Li Y, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for efficient production of (3*R*)-acetoin. J Chem Technol Biotechnol, 2015, 90: 93-100.

[11] Crout D, Littlechild J, Morrey S. Acetoin metabolism: stereochemistry of the acetoin produced by the pyruvate decarboxylase of wheat germ and by theα-acetolactate decarboxylase of *Klebsiella aerogenes*. J Chem Soc Perkin 1, 1986: 105-108.

[12] Kochius S, Paetzold M, Scholz A, et al. Enantioselective enzymatic synthesis of the α-hydroxy ketone (*R*)-acetoin from *meso*-2,3-butanediol. J Mol Catal B Enzym, 2014, 103: 61-66.

[13] Wachtmeister J, Rother D. Recent advances in whole cell biocatalysis techniques bridging from investigative to industrial scale. Curr Opin Biotechnol, 2016, 42: 169-177.

[14] Xie N Z, Li J X, Song L F, et al. Genome sequence of type strain *Paenibacillus polymyxa* DSM 365, a highly efficient producer of optically active (*R*,*R*)-2,3-butanediol. J Biotechnol, 2014, 195: 72-73.

[15] 奥斯伯 M F, 金斯顿 E R, 赛德曼 G J, et al. 精编分子生物学实验指南(译). 第四版. 北京: 科学出版社; 2005. 887-888.

Ausubel F M, Kingston R E, Seidman J G, et al. Short protocols in molecular biology, 4th ed. Bejing: Science press; 2005. 887-888.

[16] Ji X, Huang H, Ouyang P. Microbial 2,3-butanediol production: A state of the art review. Biotechnol Adv, 2011, 29: 351-364.

[17] Häßler T, Schieder D, Pfaller R, et al. Enhanced fed-batch fermentation of 2,3-butanediol by *Paenibacillus polymyxa* DSM 365. Bioresour Technol, 2012, 124: 237-244.

[18] Xie NZ, Chen XR, Wang QY, et al. Microbial routes to (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol: Recent advances and future prospects. Curr Top Med Chem, 2017, 17: 2433-2439.

[19] 李亿，李检秀，刘海余, et al. 多粘类芽孢杆菌同步糖化发酵玉米粉生产(*R,R*)-2,3-丁二醇. 广西科学. 2016, 23: 41-46.

Li Y, Li J X, Liu H Y, et al. Simultaneous sccharification and (*R,R*)-2,3-butanediol fermentation from corn flour by *Paenibacillus polymyxa.* Guangxi Sciences, 2016, 23: 41-46.

[20] Gao J, Xu Y Y, Li F W,et al. Production of *S*-acetoin from diacetyl by *Escherichia coli* transformant cells that express the diacetyl reductase gene of *Paenibacillus polymyxa* ZJ-9. Lett Appl Microbiol, 2013, 57: 274-281.

[21] Xiao Z, Lv C, Gao C, et al. A novel whole-cell biocatalyst with NAD^+ regeneration for production of chiral chemicals. PLoS One, 2010, 5: e8860.

[22] Yamamoto H, Mitsuhashi K, Kimoto N, et al. A novel NADH-dependent carbonyl reductase from *Kluyveromyces aestuarii* and comparison of NADH-regeneration system for the synthesis of ethyl (*S*)-4-chloro-3-hydroxybutanoate. Biosci Biotechnol Biochem, 2004, 68: 638-649.

[23] Nina R, Markus N, Andreas L, et al. Characterization of a whole-cell catalyst co-expressing glycerol dehydrogenase and glucose dehydrogenase and its application in the synthesis of L-glyceraldehyde. Biotechnol Bioeng, 2010, 106: 541-552.